家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 4(serpin-4)的基因克隆、原核表达和多克隆抗体制备

查宏贤[1,2], 刘　罡[2], 张　晨[2], 王彦云[1,2], 卫正国[1,2],
李　兵[1,2], 陈玉华[1,2], 许雅香[1,2,*], 沈卫德[1,2]
(1. 现代丝绸国家工程实验室, 江苏苏州 215123; 2. 苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏苏州 215123)

摘要: 丝氨酸蛋白酶抑制剂 4(serpin-4)为丝氨酸蛋白酶抑制剂家族中的一员。本研究旨在研制高效价的家蚕 *Bombyx mori* serpin-4 多克隆抗体, 为深入研究 *serpin-4* 基因的生理功能打下物质基础。首先于家蚕脂肪体中克隆了 *serpin-4* 基因, 利用基因重组技术构建了 pET28a-*serpin-4* 原核表达载体, 经 IPTG 诱导, 获得原核表达重组融合蛋白, 利用镍柱回收纯化技术, 获得目的蛋白; 经 SDS-PAGE 和抗 His 多抗检测, 纯化蛋白的分子量大小与预测的一致, 即获得了高纯度的目的蛋白, 以此蛋白为免疫抗原, 采用 4 次免疫方式对昆明小鼠进行抗原免疫, 最终获得抗 serpin-4 的多克隆抗体血清; 该血清经 ELISA 和 Western blot 验证, 效价达到 1:20 000, 特异性较好。家蚕 serpin-4 多克隆抗体的成功制备, 一方面表明应用于其他生物的多克隆抗体制备所采用的方法对于家蚕 serpin 基因的研究同样适用; 另一方面, 也为深入研究家蚕 serpin-4 的生理功能打下了物质基础。

关键词: 家蚕; 丝氨酸蛋白酶抑制剂; 基因克隆; 原核表达; 蛋白纯化; 多克隆抗体
中图分类号: Q966　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2011)06-0642-06

Cloning, prokaryotic expression and preparation of polyclonal antibody of serine protease inhibitor 4 (serpin-4) from *Bombyx mori*

ZHA Hong-Xian[1,2], LIU Gang[2], ZHANG Chen[2], WANG Yan-Yun[1,2], WEI Zheng-Guo[1,2], LI Bing[1,2], CHEN Yu-Hua[1,2], XU Ya-Xiang[1,2,*], SHEN Wei-De[1,2] (1. National Engineering Laboratory for Modern Silk, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China; 2. School of Basic Medicine and Biological Sciences, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

Abstract: Serine protease inhibitor 4 (serpin-4) is a member of serine protease inhibitor family. This investigation aims to research and produce high-titer polyclonal antibody against serpin-4 in *Bombyx mori*, which will lay a material foundation to further inquiry the physiological function of *serpin-4* gene. The *serpin-4* gene was first cloned from fat body of *B. mori* and then was cloned into pET28a prokaryotic expression vector by using genetic recombinant technology. The recombinant vector was transferred into *Escherichia coli* and the transferred *E. coli* was induced by IPTG in order to acquire prokaryotic expression recombinant fusion protein which was subsequently purified by Ni column. The molecular weight of the purified protein identified by SDS-PAGE and polyclonal antibody against His-tag was consistent with prediction, indicating that the interest protein with high purity was obtained. The acquired protein was employed as antigen to immunize KM mouse by four separate immunizations and ultimately the polyclonal antibody serum against serpin-4 was achieved. The serum titer validated by ELISA and Western blot was 1∶20 000. The successful preparation of polyclonal antibody against serpin-4 in *B. mori* demonstrated that the method applied in other organisms of preparing polyclonal antibody was also applicable to study *serpin-4* gene of *B. mori*, and this study laid a material foundation to further investigate the physiological function of *serpin-4* gene.

Key words: *Bombyx mori*; serine protease inhibitor; gene cloning; prokaryotic expression; protein purification; polyclonal antibody

---

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设家蚕生理生态岗(CARS-22-ZJ0305)
作者简介: 查宏贤, 男, 1985 年生, 江苏苏州人, 硕士研究生, 主要从事家蚕分子生物学研究, E-mail: mtvtlc@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: xuyaxiang@suda.edu.cn
收稿日期 Received: 2010-10-25; 接受日期 Accepted: 2011-01-31

丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpins)蛋白家族是一个成员众多、分布广泛的蛋白酶抑制剂家族。迄今为止，已在动物、植物、细菌和病毒中发现 1 500 多种 serpins (Law *et al*., 2006)。研究发现大多数 serpins 作为调节因子参与生理反应(Ligoxygakis *et al*., 2002; Abraham *et al*., 2005; Zou and Jiang, 2005; Colinet *et al*., 2009)，高等生物体内 serpins 可调节血液中的蛋白酶(Kanost *et al*., 1989; Gan *et al*., 2001; Theopold *et al*., 2004; Wang and Jiang, 2004)，昆虫中 serpin 成员在酚氧化酶原活化反应中具有调节作用(Gregorio *et al*., 2002; Michel *et al*., 2005; Tong and Kanost, 2005; Cerenius *et al*., 2008)。

目前对昆虫 serpin 家族成员的研究主要集中在 serpin1－6，其中对 serpin-4 的研究主要在烟草天蛾 *Manduca sexta*。Tong 和 Kanost(2005)发现烟草天蛾 serpin-4A 参与免疫反应，抑制多种血淋巴蛋白酶，如烟草天蛾 serpin-4 抑制了血液中酚氧化酶原的活化级联反应；使用革兰氏阴性菌和阳性菌刺激烟草天蛾后，serpin-4 与血液中的 HP1 形成复合物；并且，serpin-4 还同时与 HP21 以及另外两个未鉴定的蛋白酶形成复合物。Zou 等(2009)将家蚕 34 条 serpin 序列进行了进化分析，发现家蚕 serpin-4 与烟草天蛾的 serpin-4A 有较高同源性。

一直以来，国内外研究人员对家蚕 serpin 家族成员的研究多数集中在家蚕体内 mRNA 水平表达研究，对蛋白水平上的调节方式和生物学意义相关的研究尚未见报道。为了深入研究家蚕 serpin-4 的功能，我们尝试制备能够用于 serpin-4 蛋白表达检测及表达定位的抗体。

1　材料与方法

1.1　材料与主要试剂

实验材料是家蚕大造品种，由本实验室饲养。于 5 龄第 4 天解剖分离生殖腺，液氮速冻后保存于－80℃备用。

实验昆明小鼠由苏州大学动物实验中心实验室提供。

分子克隆中使用的各种试剂购自 TaKaRa 公司。PCR 产物由上海生工测序。蛋白纯化试剂盒购自 Thermo 公司，抗体购自 Promega 公司。

1.2　serpin-4 基因克隆

用 Trizol 提取 RNA，M-MLV 反转录为 cDNA 第一链，并以此 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。所有步骤均按试剂盒说明操作。

去除信号肽的 *serpin-4* cDNA 由 PCR 扩增获得。引物序列为 F：5′-GGATCCCAAAATATTCCTAAGGCGACTAATC-3′（下划线表示设计的 *Bam*H Ⅰ 酶切位点）；R：5′-CGTCGACTTAGTAAAGTGATGGCTCCGT-3′（下划线表示设计的 *Sal* Ⅰ 酶切位点）。PCR 扩增条件为：95℃预变性 5 min，94℃变性 30 s，58℃退火 30 s，72℃延伸 1.5 min，30 个循环，最后 72℃终循环 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离并回收纯化。

1.3　重组表达载体的构建

将纯化的目的片段与 pUC-T 载体连接后，再将连接产物转化至大肠杆菌 *Escherichia coli* Top10 中。挑选阳性克隆进行酶切鉴定和测序验证，命名为 T-S4。

T-S4 使用 *Bam*H Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 酶切后获得目的片段。纯化后将产物插入 pET28a 质粒载体中。挑选阳性克隆经酶切鉴定和测序验证，命名为 pET28a-*serpin-4*。

1.4　生物信息学分析

蛋白质序列分析采用 ExPASy 在线 ScanProsite 程序(http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)；蛋白质分子量预测采用 http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html 在线工具。

1.5　融合蛋白的诱导表达及 Western blot 检测

将重组质粒 pET28a-*serpin-4* 转入 BL21。挑选阳性克隆接种于 3 mL LB 培养液中 37℃，200 rpm 过夜培养。取菌液 3 mL 接种于 300 mL LB 培养液中 37℃培养。当 A_{600} 检测值是 0.6 时，加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L。继续培养 6 h。使用 12% SDS-PAGE 检测重组蛋白表达情况。

SDS-PAGE 后，电泳胶置于半干转印液中(48 mmol/L Tris-HCl，39 mmol/L 甘氨酸，20% 甲醇，pH 9.2)，蛋白转移至 NC 膜中。常温下孵育(5% BSA，溶于 PBS 中) 1 h。洗液（PBS-Tween buffer）洗 3 次，每次 10 min。鼠抗 His 标签蛋白(1∶800)作为一抗包被，37℃，1 h。如上所述在洗液中漂洗，羊抗鼠 IgG(1∶1 200)作为二抗包被，37℃，1 h。洗液中漂洗 3 次，DAB 显色。

1.6　重组蛋白的纯化

诱导菌液离心 10 000 rpm，10 min，收集细胞。细胞在超声裂解液(1.0 mL Triton X-100，2.5 mL 2 mol/L Tris-HCl，pH 8.0)中悬浮。超声裂解悬浮液(80 w，超声持续 10 s，暂停 10 s，共 30 min)。

超声结束后悬浮液离心 5 000 rpm，30 min，弃上清，重悬沉淀，置于 4℃过夜。

根据重组蛋白回收试剂盒操作说明进行亲和柱纯化。待总蛋白吸附以后，用 Wash Buffer 1（35 mmol/L Tris，150 mmol/L NaCl，10 mmol/L 咪唑，5% 甘油，6 mol/L 尿素，pH 7.2，0.5 × proprietary B-PER Reagent additive）和 Wash Buffer 2（60 mL，含 50 mmol/L Tris，300 mmol/L NaCl，25 mmol/L 咪唑，6 mol/L 尿素，10% 甘油，pH 6.8）充分清洗亲和柱。然后用 Elution buffer（44.7 mL，含 50 mmol/L Tris，300 mmol/L NaCl，200 mmol/L 咪唑，10% 甘油，pH 6.8，6 mol/L 尿素）洗脱，收集洗脱液，SDS-PAGE 检测洗脱液中的纯化蛋白。

1.7 多克隆抗体制备

将纯化好的重组蛋白作为抗原免疫 3 只昆明小鼠，具体步骤为：蛋白质与等体积弗氏完全佐剂混匀，皮下注射小鼠，0.04 mg 蛋白/只小鼠（一免）；一免 3 周后进行 2 免，蛋白质与等体积弗氏不完全佐剂混匀，皮下注射小鼠，0.04 mg 蛋白/只小鼠；二免 2 周后进行 3 免，蛋白质与等体积弗氏不完全佐剂混匀，皮下注射小鼠，0.04 mg 蛋白/只小鼠；三免 1 周后进行 4 免，蛋白质与等体积弗氏不完全佐剂混匀，皮下注射小鼠，0.04 mg 蛋白/只小鼠，四免 7 d 后采血，分离血清。20 μL/管分装，-20℃保存。ELISA 检测抗体效价。同时取注射空白洗脱液的小鼠血清作为阴性对照。

1.8 ELISA 测定抗血清效价

纯化的 serpin-4 重组蛋白作为底物填充酶标板，终浓度为每孔 10 μg/mL，每孔加入 100 μL 包被液，4℃过夜。使用洗液（PBS-Tween buffer，Tween 0.05 mol/L）洗 3 次。每孔加入 3% BSA 稀释液 200 μL孵育，37℃ 1 h。洗液清洗 3 次后加入不同稀释度的多克隆抗血清（1∶200，1∶500，1∶1 000，1∶2 000，1∶5 000，1∶10 000，1∶20 000，1∶24 000 和 1∶36 000），每孔 150 μL。对照组用阴性血清，稀释相应倍数，每孔 150 μL。37℃孵育 2 h 后，洗液清洗 3 次，加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG（1∶1 200）溶液，每孔 150 μL，37℃孵育 1 h。洗液洗涤 3 次后每孔加入 150 μL 新鲜的 TMB 显色液，37℃避光反应 30 min。最后每孔加入 150 μL 2 mol/L H_2SO_4 终止反应。使用酶标仪测定 490 nm 光波吸光值。

1.9 Western blot 检测多克隆抗血清特异性

SDS-PAGE 电泳后，纯化的 serpin-4 重组蛋白胶带置于半干转印液中（48 mmol/L Tris-HCl，39 mmol/L 甘氨酸，20% 甲醇，pH 9.2），蛋白转移至 NC 膜中。常温下孵育（5% BSA，溶于 PBS 中）1 h。洗液洗（PBS-Tween buffer）3 次，每次 10 min。抗 serpin-4 多克隆抗血清（1∶400）作为一抗包被，37℃，1 h。如上所述在洗液中漂洗，羊抗鼠 IgG（1∶1 200）作为二抗包被，37℃，1 h。洗液中漂洗 3 次，DAB 显色。

2 结果和分析

2.1 家蚕 serpin-4 基因的克隆和表达载体的构建

以反转录所得 cDNA 为模板对 *serpin-4* 基因进行 PCR 扩增，得到一条约 1 200 bp 条带（图 1）。将 PCR 扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳分离，切取目的条带纯化回收后，连接到 pUC-T 载体上。经酶切后电泳，得到一条约 1 200 bp 的片段（图 2），最后测序验证。NCBI 登录序列号：GU270470（图 3）。

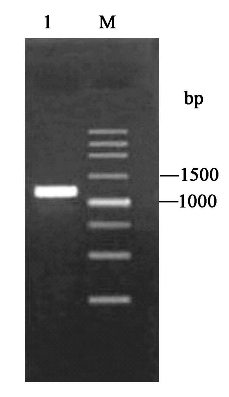


图 1 家蚕 *serpin-4* 基因 PCR 产物电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis analysis of the PCR products of *Bombyx mori serpin-4* gene

1：PCR 产物 PCR products；M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker.

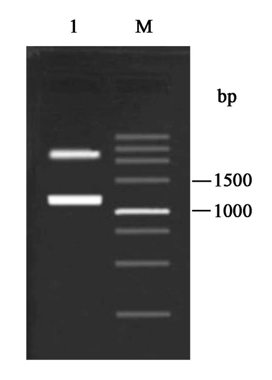


图 2 双酶切验证重组的 pUC-T-*serpin-4*

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pUC-T-*serpin-4* by restriction analysis

1：pUC-T-*serpin-4* 使用 *Bam*H Ⅰ 和 *Sal* Ⅰ 双酶切；pUC-T-*serpin-4* digested with *Bam*H Ⅰ and *Sal* Ⅰ；M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker.

1 CAA AAT ATT CCT AAG GCG ACT AAT CTC CAC AAT GGG CTC ACC GAA AAG ATT GGA AAT TTT TCC ATT GAA
1 Gln Asn Ile Pro Lys Ala Thr Asn Leu His Asn Gly Leu Thr Glu Lys Ile Gly Asn Phe Ser Ile Glu
70 TTA TTG TAT CAC ACC TCG AAT TTG GAG CAG AGT AAA GGT AAC TTG ATT ATG TCT CCA ATC ACC GTT TGG
24 Leu Leu Tyr His Thr Ser Asn Leu Glu Gln Ser Lys Gly Asn Leu Ile Met Ser Pro Ile Thr Val Trp
139 ACG GTT TTG GCG GTA ATA GCT GAA GGC GCG TCT GGG AAT ACG AGA CGG CAG ATC AAT CAC GCG TTA CGG
47 Thr Val Leu Ala Val Ile Ala Glu Gly Ala Ser Gly Asn Thr Arg Arg Gln Ile Asn His Ala Leu Arg
208 CTA CAA GCA AAG CAT ACG AAC GTC ACT CGA AGC GAA TTC CAA AAA ATC TCA GAA TGG CTC CGA GTC AAC
70 Leu Gln Ala Lys His Thr Asn Val Thr Arg Ser Glu Phe Gln Lys Ile Ser Glu Trp Leu Arg Val Asn
277 ACG AAC ACA ATA GAA CTC GCC AAA ATC AAT GCC ATA ATT GTC GAT AAG CAA CGT TTG CCA CAA CAA GAC
93 Thr Asn Thr Ile Glu Leu Ala Lys Ile Asn Ala Ile Ile Val Asp Lys Gln Arg Leu Pro Gln Gln Asp
346 TTT CAT GAC AAT GCA AAG ACC TAT TAT GAA ACT GAT ATG ATA ACA CTT AAC TTC GAA GAT GCA CAG AAC
116 Phe His Asp Asn Ala Lys Thr Tyr Tyr Glu Thr Asp Met Ile Thr Leu Asn Phe Glu Asp Ala Gln Asn
415 TCT GCT AAT TTA TTG AAT TCA GCC ATC TCC AAC TTC ACC CAT GGT AAA ATA CCA AAG ATA GTT GAC ACC
139 Ser Ala Asn Leu Leu Asn Ser Ala Ile Ser Asn Phe Thr His Gly Lys Ile Pro Lys Ile Val Asp Thr
484 GGT AGT TTC CAA GAC TCC CAA ATG CTG TTG ACT AGT GCA CTC TAT TTT AAA GGT CAG TGG ACT ATA CCA
162 Gly Ser Phe Gln Asp Ser Gln Met Leu Leu Thr Ser Ala Leu Tyr Phe Lys Gly Gln Trp Thr Ile Pro
553 TTT AAC ACA TCG TCT ACA TCA AAA CTA CCT TTT TAC AAT AGT AAA GGT GAA AAA ATT GGT GAA GTG AAC
185 Phe Asn Thr Ser Ser Thr Ser Lys Leu Pro Phe Tyr Asn Ser Lys Gly Glu Lys Ile Gly Glu Val Asn
622 ATG ATG TAC AAT CGA CAT ACA TAT CCA TTC TCG AAC ATT AAA ATA TTA AAT GCA AGA GTC ATT GAG TTG
208 Met Met Tyr Asn Arg His Thr Tyr Pro Phe Ser Asn Ile Lys Ile Leu Asn Ala Arg Val Ile Glu Leu
691 CCA TAC GGT GTA GAA AAC CGC TTG TCA ATG TTA ATC ATG GTG CCA AAC CCT GGT GTT TCA CTT GCA AGT
231 Pro Tyr Gly Val Glu Asn Arg Leu Ser Met Leu Ile Met Val Pro Asn Pro Gly Val Ser Leu Ala Ser
760 ATG TTC ATG AAG TTC AAG GAG CTT TCA TTA GAT TCA TTC TTT GAA GAA TTG CGC ATC TCT AAG GAG GAA
254 Met Phe Met Lys Phe Lys Glu Leu Ser Leu Asp Ser Phe Phe Glu Glu Leu Arg Ile Ser Lys Glu Glu
829 TTT TCA GAT GAT GAA GTC GAT TGT TTC ATT CCG AGA TTC AAA ATT GAG TCT AAT TTG GAT ATG ACA TCG
277 Phe Ser Asp Asp Glu Val Asp Cys Phe Ile Pro Arg Phe Lys Ile Glu Ser Asn Leu Asp Met Thr Ser
898 GTG TTG AAG GAT GCC ATG GGT ATC GAG GAT TTG TTT GAT GCG AGG AAA GCT GTT TTA CCA CAT ATG GCT
300 Val Leu Lys Asp Ala Met Gly Ile Glu Asp Leu Phe Asp Ala Arg Lys Ala Val Leu Pro His Met Ala
967 CGG ACT CCT ATG TTT GTG TCG AAA GTG GTA CAC AAA GCA GAA ATT GAA GTT ACA GAA GCA GGA ACA ACA
323 Arg Thr Pro Met Phe Val Ser Lys Val Val His Lys Ala Glu Ile Glu Val Thr Glu Ala Gly Thr Thr
1036 GCT GCC GGA GTA ACA GTC GCA GAA TTC AGC AAC CGA ATA GGA GTT GTA AGA TTT GAG GCG AAT CGT CCC
346 Ala Ala Gly Val Thr Val Ala Glu Phe Ser Asn Arg Ile Gly Val Val Arg Phe Glu Ala Asn **Arg** Pro
1105 TTC ACT TAC ATG ATT GTA GAG AAA GTA ACA AAT TCA ATT GTA TTT GGA GGC TTT TAT ACG GAG CCA TCA
369 Phe Thr Tyr Met Ile Val Glu Lys Val Thr Asn Ser Ile Val Phe Gly Gly Phe Tyr Thr Glu Pro Ser
1174 CTT TAC TAA G
392 Leu Tyr End

图 3　*serpin-4* 的 cDNA 序列及推导的氨基酸序列

Fig. 3　The cDNA and deduced amino acid sequences of *serpin-4*

双下划线表示蛋白羧基端推测的糖基化位点 Potential N-linked glycosylation sites (S) are indicated by double line；下划线表示推测的活性螺旋中心 The predicted reactive center loop is underlined with single line；P1 位点使用粗体标出 The predicted P1 site is in boldface.

T-*serpin-4* 通过 *Sal* Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切形成粘性末端，然后连接到 pET28a 原核表达载体，转化到克隆宿主菌 Top10 中。挑选阳性克隆进行双酶切验证(图 4)。

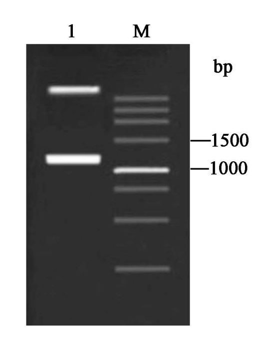


图 4　重组质粒 pET28a-*serpin-4* 双酶切验证

Fig. 4　Identification of recombinant plasmid pET28a-*serpin-4* by restriction analysis

1：pET28a-*serpin-4* 使用 *Bam*H Ⅰ and *Sal* Ⅰ 双酶切后验证 pET28a-*serpin-4* digested with *Bam*H Ⅰ and *Sal* Ⅰ；M：DNA 分子量标准 DNA molecular weight marker.

2.2　serpin-4 重组蛋白的诱导表达和 Western blot 分析

将 pET-*serpin-4* 质粒转化到表达宿主菌 BL21，加入 IPTG 于 37℃ 诱导 pET-*serpin-4*-BL21 表达重组蛋白，得到一个约 48 kD 的融合蛋白。随后进行 Western blot 分析表达蛋白，之后对 serpin-4 重组蛋白纯化回收，12% SDS-PAGE 检测回收效果(图 5)。

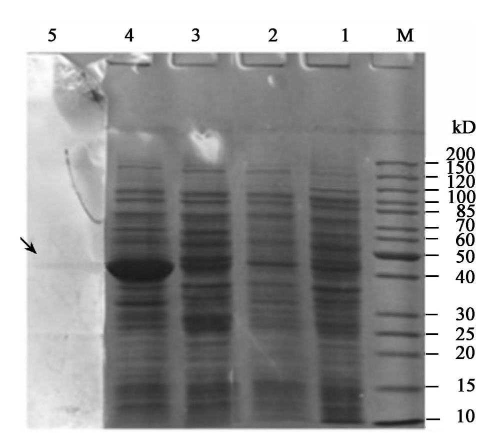


图 5 *serpin-4* 基因表达产物的 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 分析

Fig. 5 SDS-PAGE and Western blot analysis of the expressed product of pET28a-*serpin-4*

M：蛋白质分子量标准物 Protein molecular weight marker；1：无质粒转化的 BL21 菌的表达 *Escherichia coli* strain BL21；2：空载体 pET28a 转化 BL21 菌后的表达 Expressed product of pET28a；3：非诱导的转化去信号肽 *serpin-4* 的 BL21 菌的表达 Expressed product of pET28a-*serpin-4* without signal peptide not induced by IPTG；4：经 1 mmol/L IPTG 诱导的去信号肽 pET28a-*serpin-4* 的表达 Expressed product of pET28a-*serpin-4* without signal peptide induced by 1 mmol/L IPTG；5：经 1 mmol/L IPTG 诱导去信号肽的 pET28a-*serpin-4* 的 Western blot Western blot of expressed product of pET28a-*serpin-4* without signal peptide induced by 1 mmol/L IPTG.

2.3 ELISA 和 Western blot 检测多克隆抗体

使用 ELISA 测定抗 serpin-4 多克隆抗体效价。将抗血清稀释不同浓度（1∶200 ~ 1∶36 000），以纯化的 serpin-4 融合蛋白作为底物。注射空白洗脱液的昆明小鼠的血清作为阴性对照。检测结果显示多克隆抗体效价达到 1∶20 000。

使用 Western blot 检测多克隆抗体活性。将多克隆抗体（1∶400）作为一抗。结果如图 6 所示。

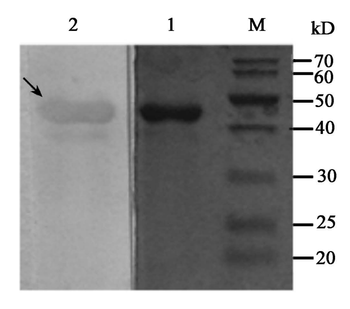


图 6 重组蛋白纯化和抗 serpin-4 多克隆抗体的 Western blot 分析

Fig. 6 SDS-PAGE and Western blot analysis of the polyclonal antibody of serpin-4

M：蛋白质分子量标准物 Protein molecular weight marker；1：纯化的重组蛋白 Purified recombinant protein；2：抗 serpin-4 多克隆抗体 Anti-serpin-4 monoclonal antibody.

3 讨论

参照 Zou 等（2009）报道，我们从家蚕脂肪体中克隆了 *serpin-4* 基因。将目的基因插入 pET28a（+）表达载体。选用 pET 系统是因为该载体具有很强的表达重组蛋白的能力。另外，本次实验选用的 pET28a（+）载体本身包含 His 序列，这意味着载体表达的重组蛋白含有 His 融合标签，有利于后期纯化，获得高纯度和高浓度的重组蛋白。

为获得可溶性表达产物，我们在不同时间段采用较低的温度以及降低诱导物浓度来表达重组蛋白，但在裂解菌液上清中难于找到重组蛋白，表达产物仍然多以包涵体形式存在。这可能与 pET 系统高效表达有关。蛋白表达量越高越容易形成包涵体，原因可能是合成速度太快，以至于没有足够的时间进行折叠，二硫键不能正确地配对；另一方面，促使真核蛋白正确折叠的各种影响因子在原核表达系统中有所缺失，这也在一定程度上促进了包涵体的形成。考虑到本研究的目的就是要制备多克隆抗体，形成包涵体并不影响抗体制备。

我们采用镍柱纯化体系纯化融合蛋白，该体系可高效纯化含有 His 融合标签的重组蛋白，我们获得了制备多克隆抗体所需要的高纯度、高浓度抗原。

为了获得高特异性、高效价的抗 serpin-4 多克隆抗体，我们选用了免疫周期长，少量多次的 4 次免疫这一经典免疫学方法。免疫间隔时间是影响抗体产生的主要因素，我们进行第 1 次免疫与第 2 次免疫的间隔时间为两周，间隔时间太长则刺激减弱，抗体效价不高。以后每次免疫间隔时间逐次减少。同时，为了增强抗原免疫原性，我们采用添加佐剂的方法以刺激机体产生较强的免疫应答。

我们成功克隆了 *serpin-4* 基因，并构建了 pET28a-*serpin-4* 原核表达载体，经 IPTG 诱导表达，获得了大量融合蛋白。采用效果突出的镍柱纯化体系对融合蛋白进行了纯化，经 SDS-PAGE 和抗 His 多抗检测，纯化蛋白分子量大小与预测的一致，即获得了高纯度的目的蛋白，也即免疫抗原。我们选用 4 次免疫方式对昆明小鼠进行抗原免疫，最终获得抗 serpin-4 的多克隆抗体血清；该血清经 ELISA 和 Western blot 验证，效价达到 1∶20 000，特异性较好。

家蚕 serpin-4 多克隆抗体的成功制备，一方面，表明应用于其他生物的多克隆抗体制备所采用的方

法对于家蚕 serpin 基因的研究同样适用；另一方面，也为深入研究家蚕 serpin-4 的生理功能，比如 serpin-4 在不同家蚕品种、不同生长发育期和不同组织内的蛋白表达谱研究以及蛋白定位，鉴定 serpin-4 的分子伴侣等打下了物质基础。

参 考 文 献 (References)

Abraham EG, Pinto SB, Ghosh A, Vanlandingham DL, Budd A, Higgs S, Kafatos FC, Jacobs-Lorena M, Michel K, 2005. An immune-responsive serpin, SRPN6, mediates mosquito defense against malaria parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(45):16327 - 16332.

Cerenius L, Lee BL, Söderhäll K, 2008. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology*, 29(6): 263 - 271.

Colinet D, Dubuffet A, Cazes D, Moreau S, Drezen JM, Poirié M, 2009. A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase cascade. *Developmental and Comparative Immunology*, 33(5): 681 - 689.

Gan H, Wang Y, Jiang HB, Mita K, Kanost MR, 2001. A bacteria-induced, intracellular serpin in granular hemocytes of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31(9): 887 - 898.

Gregorio ED, Han SJ, Lee WJ, Baek MJ, Osaki T, Kawabata SI, Lee BL, Iwanaga S, Lemaitre B, Brey PT, 2002. An immune-responsive serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Developmental Cell*, 3(4): 581 - 592.

Kanost MR, Prasad SV, Wells MA, 1989. Primary structure of a member of the serpin superfamily of proteinase inhibitors from an insect, *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.*, 264(2): 965 - 972.

Law RH, Zhang QW, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, Rosado CJ, Langendorf CG, Pike RN, Bird PI, Whisstock JC, 2006. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biology*, 7(5): 216.1 - 216.10.

Ligoxygakis P, Pelte N, Ji CY, Leclerc V, Duvic B, Belvin M, Jiang HB, Hoffmann JA, Reichhart JM, 2002. A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila*. *The EMBO Journal*, 21(23): 6330 - 6337.

Michel K, Budd A, Pinto S, Gibson TJ, Kafatos FC, 2005. *Anopheles gambiae* SRPN2 facilitates midgut invasion by the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *EMBO Rep.*, 6(9): 891 - 897.

Theopold U, Schmidt O, Söderhäll K, Dushay MS, 2004. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. *Trends in Immunology*, 25(6): 289 - 294.

Tong YR, Kanost MR, 2005. *Manduca sexta* serpin-4 and serpin-5 inhibit the prophenol oxidase activation pathway: cDNA cloning, protein expression, and characterization. *J. Biol. Chem.*, 280(15): 14923 - 14931.

Wang Y, Jiang HB, 2004. Purification and characterization of *Manduca sexta* serpin-6: a serine proteinase inhibitor that selectively inhibits prophenoloxidase-activating proteinase-3. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34(4): 387 - 395.

Zou Z, Jiang HB, 2005. *Manduca sexta* serpin-6 regulates immune serine proteinases PAP-3 and HP8. *J. Biol. Chem.*, 280(14): 14341 - 14348.

Zou Z, Zhao P, Hua W, Mita K, Jiang HB, 2009. A comparative analysis of serpin genes in the silkworm genome. *Genomics*, 93(4): 367 - 375.

(责任编辑：赵利辉)